西花蓟马化学感受蛋白的 cDNA 克隆、时空表达分析及组织定位

张治科[1,2]，吴圣勇[2]，雷仲仁[2,*]

（1. 宁夏农林科学院植物保护研究所，银川 750002；2. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193）

摘要：【目的】研究西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)在其嗅觉及化学感受系统中的作用。【方法】利用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆西花蓟马化学感受蛋白基因,用 DNAMAN 软件进行序列分析,使用 BLAST 进行同源性比较,采用 MEGA6 的 Neighbor-joining 法构建了进化树。通过实时定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 检测了西花蓟马不同发育期以及成虫不同组织(触角、头、足、胸、腹)中该基因的表达谱。免疫新西兰大白兔制备了 FoccCSP1 蛋白抗体,与样品切片中 FoccCSP1 蛋白以及 10 nm 胶体金颗粒偶联的羊抗兔二抗反应,经透射电镜观察,对该蛋白在西花蓟马成虫组织中进行免疫定位。【结果】克隆并鉴定了一个西花蓟马化学感受蛋白基因,命名为 *FoccCSP1*(GenBank 登录号:KM527949)。该基因 cDNA 序列全长 597 bp,完整开放阅读框(ORF)288 bp,编码 95 个氨基酸,成熟蛋白分子量 11.377 kD,等电点 4.72,具有化学感受蛋白典型的 4 个保守半胱氨酸位点特征。FoccCSP1 与东亚飞蝗 *Locusta migratoria* LmigCSP(GenBank 登录号: CAJ01476.1)的氨基酸序列一致性最高,进化关系最近。*FoccCSP1* 在西花蓟马不同发育阶段和成虫不同组织中均有表达,在羽化 1 d 的雌虫中相对表达量最高,其次是 2 龄若虫,蛹和成虫后期表达量最低;在触角和足中相对表达量较高。成功构建了重组表达质粒 pET-30a/*FoccCSP1*, 并诱导表达,经 Ni 柱纯化,获得目的蛋白;免疫定位表明,该蛋白在西花蓟马触角、足、头等部位血淋巴中均大量存在。【结论】明确了西花蓟马化学感受蛋白基因 *FoccCSP1* 的核苷酸、氨基酸序列特征。*FoccCSP1* 广泛分布在西花蓟马多个组织及各个发育期,据此推测该基因可能在西花蓟马嗅觉识别、感受机械刺激以及调节生长发育等方面扮演重要角色。

关键词：西花蓟马；化学感受蛋白；分子克隆；原核表达；表达谱；免疫定位

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2015)01-0001-14

cDNA cloning, expression profiling and immunolocalization of a chemosensory protein in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thtipidae)

ZHANG Zhi-Ke[1,2], WU Sheng-Yong[2], LEI Zhong-Ren[2,*] (1. Institute of Plant Protection, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract:【Aim】To study the function of chemosensory proteins (CSPs) in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*.【Methods】A CSP gene from *F. occidentalis* was cloned using RT-PCR and RACE-PCR strategies. Nucleotide sequence was analysed using DNAMAN software. Homology was analysed using BLAST. A neighbor-joining tree was constructed using MEGA6. Expression profiles of *FoccCSP1* in different developmental stages and different tissues of adults (antennae, head, legs, thorax and abdomen) were assayed using real-time quantitative PCR (qRT-PCR). Polyclonal antisera were prepared by immunizing New Zealand white rabbits with purified protein, and reacted with this protein in slices and 10 nm colloidal gold-affinipure goat anti-rabbit IgG. The immunolocalization of FoccCSP1 protein in adult tissues was clarified by transmission electron microscope.【Results】A new chemosensory protein gene was cloned and identified from *F. occidentalis* and named *FoccCSP1* (GenBank accession

基金项目：现代农业产业技术体系专项资金(CARS-25-B-07)；北京国家现代农业科技城产业培育项目(Z121100001212006)

作者简介：张治科，男，1980 年生，宁夏同心人，博士研究生，副研究员，研究方向为昆虫生态与综合防治及昆虫化学生态学，E-mail：zhangzhike98@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zrlei@ippcaas.cn

收稿日期 Received: 2014-09-22；接受日期 Accepted: 2015-01-02

number: KM527949). *FoccCSP*1 cDNA contains a 288 bp open-reading frame encoding a putative protein of 95 amino acids with the molecular mass of 11.377 kD and the isoelectric point of 4.72. The deduced amino acid sequence contains the typical four-cysteine signature like CSPs from other insects. FoccCSP1 shows the highest amino acid sequence identity and the closest evolutionary relationship with LmigCSP (GenBank accession number: CAJ01476.1) of *Locusta migratoria*. *FoccCSP*1 was predominantly expressed in 1-day-old female adults and the 2nd instar nymphae, and also highly expressed in antennae and legs. The recombinant expressed plasmid pET-30a/*FoccCSP*1 was successfully constructed, and the recombinant protein was expressed in a prokaryotic expression system and purified by affinity chromatography using Ni-NTA-Sefinose Column. The immunocytochemistry results indicated that the lymph of antennae, legs and head was strongly labeled by anti-FoccCSP1 antisera. 【Conclusion】The sequence characteristics of nucleotides and amino acids of *FoccCSP*1 were clarified. *FoccCSP*1 is broadly expressed in multiple developmental stages and adult tissues, suggesting that FoccCSP1 might play an important role in olfactory reception, chemosensory and development regulation of *F. occidentalis*.

Key words: *Frankliniella occidentalis*; chemosensory protein; molecular cloning; prokaryotic expression; expression profile; immunolocalization

昆虫嗅觉系统在其觅食、寻偶、选择产卵场所等过程中发挥着至关重要的作用,参与此过程的蛋白主要有气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)、化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)、气味受体(olfactory receptors, ORs)、气味降解酶(odorant degrading enzymes, ODEs)以及感觉神经元膜蛋白(sensory neuron membrane proteins, SNMPs)等。化学感受蛋白首次在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 触角中发现,被命名为 olfactory specific-D (OS-D)蛋白(Mckenna *et al*., 1994)。Angeli 等(1999)在沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 触角中也发现一类与 OBP 结构和功能不同、广泛分布在昆虫各种化学感受器官、能感受环境化学刺激功能的蛋白,并将其正式命名为 CSPs。研究表明,CSPs 是一类低分子量、酸性、可溶性结合蛋白(Picimbon *et al*., 2000b),其氨基酸序列的典型特征是具有 4 个保守的半胱氨酸残基,序列相似性较高(Wanner *et al*., 2004)。

近年来,对昆虫 CSPs 功能的探索与研究是昆虫化学生态学领域的一个热点。CSPs 除在昆虫嗅觉信号识别过程中发挥着重要的角色外,还可能参与调节昆虫的生长发育、寻找寄主和取食以及感受机械刺激等生理功能。如研究表明,甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* CSPsMbraA 和 CSPMbraB 能够结合 11-十六烯基乙酸酯和顺 11-十八烯基乙酸酯等性信息素化合物(Jacquin-Joly *et al*., 2001),意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* ASP3c 能够结合酯类衍生物(Briand *et al*., 2002),刺舌蝇 *Glossina morsitans morsitans* 某些 CSPs 在取食血液后表达量显著上升(Liu *et al*., 2012),美洲大蠊 *Periplaneta americana* PameP10 在新生足中的表达量明显上升(Kitabayashi *et al*., 1998),东亚飞蝗 *Locusta migratoria* LmigCSP-II 在刺形感受器和翅中大量表达(Zhou *et al*., 2008),东亚飞蝗 CSPs 能够调节散居型和群居型昆虫之间型的转变(Guo *et al*., 2011)等。

西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande),又名苜蓿蓟马,隶属缨翅目(Thysanoptera)蓟马科(Thripidae)花蓟马属 *Frankliniella*,原产于北美洲,上世纪 70 年代后期,随着国际贸易的日益频繁,西花蓟马迅速扩散至欧洲、非洲、亚洲、美洲、大洋洲等的多个国家和地区(Kirk and Terry, 2003),成为世界性的危险性入侵害虫。2000 年,在首届中国昆明国际花卉节中,在参展的缅甸盆景上首次发现西花蓟马(蒋小龙等, 2001),随后在北京(张友军等, 2003)、云南临沧(徐家菊和韦丽莉, 2005)、山东青岛(郑长英等, 2007)等地陆续发现。戴林等(2004)、程俊峰等(2006)预测西花蓟马在我国具有广泛的适生区,其扩散危害的可能性极大。西花蓟马是一种多食性害虫,且随着西花蓟马的扩散蔓延,寄主谱仍在扩张(Yudin *et al*., 1986)。该虫以锉吸式口器进行危害,严重影响水果、花卉以及作物的产量和品质(Cockfield *et al*., 2007),同时还可传播菊花茎坏死病毒、花生环斑病毒、凤仙斑点坏死病毒等(Jones *et al*., 2005; 杜予州等, 2005; 郑长英等, 2007; 孟祥钦等, 2010),因其个体微小,为害隐蔽,为植物检疫和预防增加了难度。

目前,国内外对西花蓟马的研究主要集中在形态鉴定、生物学习性、发生危害与分布(刘宁等,

2005；吴青君等，2005，2007；盖海涛等，2010），防治方面主要通过释放天敌、有色粘板以及化学药剂进行控制（吴青君等，2005）。近年来，化学生态学的发展为有害昆虫的治理开辟了新的方向，但有关西花蓟马化学生态学的研究尚未见报道。因此，作者通过开展西花蓟马化学感受蛋白基因鉴定、时空表达及免疫定位研究，为西花蓟马更多嗅觉相关蛋白基因的发掘奠定基础，同时为阐明西花蓟马行为反应本质、与环境间的化学通讯以及高效调控技术的开发和应用提供理论依据。

1　材料和方法

1.1　供试虫源

西花蓟马为本实验室以新鲜豆角饲养的实验种群，饲养条件：温度 26 ± 1℃，相对湿度65% ± 5%，光周期 14L∶10D。

1.2　主要试剂和仪器

1.2.1　主要试剂：总 RNA 提取试剂盒 Trizol 购自 Invitrogen 公司；cDNA 第一链合成试剂盒购自 Promega 公司；RACE 试剂盒、SYBR（Premix Ex Taq™）、Ex Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶以及限制性内切酶 *Bam*HI、*Hin*d III 购自 TaKaRa 公司；琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒、质粒小量抽提试剂盒购自 Axygen 公司；克隆载体 *pEASY*-T1、感受态细胞 *Trans*1-T1 购自北京全式金生物技术有限公司；大肠杆菌 *Eshcherichia coli* BL21（DE3）PlysS 感受态细胞购自北京博迈德科技发展有限公司；原核表达载体 pET-30a（+）购自 Novagen 公司；IPTG、X-Gal、氨苄青霉素、Ni-NTA-Sefinose Column（BSP079-3）预装柱、重组牛肠激酶、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自生工®生物工程（上海）股份有限公司；VS2001 离心超滤管（Millipore，截留分子量 10 kD）购自上海基剑生物科技有限公司。

1.2.2　主要仪器：样品研磨系统（FastPrep-24，MP Biomedicals 公司）；凝胶成像系统（Biodoc-It 220，美国 UVP 公司）；酶标仪（BioTek Instrument ELx800，北京北方仪涛商贸有限公司）；超声波细胞破碎仪（南京新辰生物科技有限公司）；超微量紫外可见分光光度计（NanoDrop 2000，Thermo Scientific）；切片机（EM UC6，LEICA 公司），透射电镜（H-7500 TEM，HITACHI 公司）。引物由北京博迈德科技发展有限公司合成。

1.3　总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

用于目的基因片段扩增时，先用 CO_2 麻醉初羽化的西花蓟马，在解剖镜下切取触角并迅速置于 1.5 mL的离心管（离心管浸入液氮）中；用于测定基因组织表达谱时，分别取 1 龄、2 龄若虫，蛹，羽化 1，5，10 和15 d 的雌雄虫各 20 头以及羽化 1 d 的西花蓟马成虫数头用 CO_2 单个麻醉后立即取其触角（200 对）、足（400 条）、头（100 个，不带触角）、胸（100 个）、腹（100 个）分别放入 1.5 mL 的离心管（离心管浸入液氮）中。研磨后，按照 Aidlab 试剂盒说明书进行操作，总 RNA 溶于 30 μL RNA-free 水中，－80℃保存备用。RNA 完整性用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测，RNA 浓度和纯度用 NanoDrop 2000 超微量紫外可见分光光度计检测。用 cDNA 第一链合成试剂盒合成模板 cDNA，－20℃保存。

1.4　西花蓟马化学感受蛋白全长 cDNA 序列克隆

目的基因 cDNA 片段扩增：以本实验室测得的西花蓟马转录组数据，通过生物信息学分析，得到一化学感受蛋白基因序列片段。首先采用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物 FoccCSP1-S 和 FoccCSP1-A（表 1），以合成的 cDNA 为模板 PCR 扩增目的片段。PCR 反应体系为：10 × ExTaq Buffer 2.5 μL，$MgCl_2$（25 mmol/L）2 μL，模板 cDNA 2 μL，目的基因特异性正反向引物各 1 μL，dNTP Mix（各 2.5 mmol/L）2 μL，TaKaRa ExTaq（5 U/μL）0.25 μL，ddH_2O 14.25 μL。PCR 反应条件为：95℃ 预变性 3 min；94℃ 变性 30 s，58℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 1 min，共 30 个循环；最后 72℃ 延伸 10 min，4℃ 保存。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测，切胶后用 AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit 回收纯化，然后连接到克隆载体 *pEASY*-T1，转化到感受态细胞 *Trans*1-T1，涂布到含有 Amp +（终浓度 100 μg/mL）抗性的 LB 固体培养基中 37℃ 过夜培养，经蓝白斑筛选，挑取白色单菌落接入含有 Amp +（终浓度 100 μg/mL）抗性的 LB 液体培养基中 37℃ 200 r/min 过夜培养，经菌液 PCR 验证，将目的条带大小合适的菌液采用质粒小量抽提试剂盒（Axygen）提取质粒，送博迈德公司测序验证。

3′和 5′-末端 cDNA 序列扩增：根据测序得到的目的基因片段序列设计内、外侧特异性引物（表 1），按照 3′RACE 和 5′RACE 说明书进行 PCR，扩增产物处理方法同上述目的基因 cDNA 片段扩增，测序得到目的基因 3′-末端和 5′-末端 cDNA 序列。利用 DNAMAN 软件将扩增得到的目的基因中间片段序列、3′-末端 cDNA 序列、5′-末端 cDNA 序列进行拼接，得到目的基因全长 cDNA 序列。

表 1 本研究中所用引物

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequences	引物用途 Primer use
FoccCSP1-S	CCTGCTCAACAACTACAT	cDNA 克隆 cDNA cloning
FoccCSP1-A	ATCCTCGTCTACCTCGTA	
3′FoccCSP1 Outer	CGGCACCATCATGTCCTACC	3′端 cDNA 扩增 Amplification of 3′end cDNA(3′-RACE)
3′FoccCSP1 Inner	TACGACCCAGAGGGGAACTT	
5′FoccCSP1 Outer	AAGTTCCCCTCTGGGTCGTA	5′端 cDNA 扩增 Amplification of 5′end cDNA(5′-RACE)
5′FoccCSP1 Inner-2	CGATCCATCAGGCATTCCAT	
5′FoccCSP1 Inner-1	CAGGCATTCCATGTAGTTGTTGAG	
FoccCSP1-O-S	AT *GGATCC*ATGGTGCTGCATAACGA	开放阅读框(ORF)扩增 ORF amplification
FoccCSP1-O-A	CGC *AAGCTT*GCTATTCTTCGTCATC	
FoccCSP1-q-S	GGCACCATCATGTCCTACCT	实时荧光定量 PCR Real-time quantitative PCR
FoccCSP1-q-A	TTCGTCATCCTCGTCTACCTC	
β-actin-F	ACGACTTACAACTCCATCA	
β-actin-R	AGTGCCTCCAGACAAAA	

酶切位点用下划线标出 The restriction sites are underlined.

1.5 序列分析和进化树构建

采用 Expasy Server (http://web.expasy.org/compute_pi/)平台中的 Compute pI/MW 程序预测蛋白分子量和等电点;使用 SignalP 3.0 Serve 在线程序(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)预测信号肽;采用 BLASTx 程序(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)进行序列同源相似性搜索;采用 ClustalX 1.83 软件(Thompson *et al*., 1997)进行蛋白序列同源相似性比对,默认参数设置;使用 MEGA 6.0 软件构建蛋白系统发育进化树,用邻位相连法,重复构建 1 000 次。

1.6 西花蓟马化学感受蛋白基因表达谱分析

以西花蓟马不同发育阶段以及成虫不同组织的 cDNA 为模板,用表 1 中设计的实时荧光定量 PCR 引物及 BRYT Green® Dye 进行 RT-qPCR 扩增。反应体系:Go Taq® qPCR Master Mix(2×)10 μL,上游引物 0.5 μL,下游引物 0.5 μL,cDNA 2 μL,Nuclease-Free Water 7 μL。两步法 PCR 标准扩增程序:95℃预变性 2 min;95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环。反应后 PCR 产物进行溶解曲线测定:95℃ 1 min,55℃ 30 s,95℃ 30 s,60℃ 15 s。以超纯水代替模板 cDNA 为阴性对照。3 个生物学重复,每个样品重复 3 次。反应结束后采集目的基因和内参基因 Ct 值,利用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 相对定量法(Livak and Schmittgen, 2001),分别以羽化 10 d 雄虫的表达量和腹部中的表达量为标准参量,计算各基因在西花蓟马不同发育阶段和成虫不同组织中的相对表达量。

1.7 重组克隆质粒和重组表达质粒的构建

为了证明 3′-RACE 和 5′-RACE 片段来源于同一基因,根据拼接序列的编码区设计了一对特异性引物(FoccCSP1-O-S 和 FoccCSP1-O-A,同时为了便于将该基因亚克隆到表达载体中进行表达,在上下游引物上分别引入了 *Bam*H I 和 *Hin*d III 酶切位点),见表 1,以西花蓟马成虫触角反转录后的 cDNA 第一链为模板进行扩增。PCR 反应体系、反应条件同 1.4 节,将 PCR 产物克隆到 *pEASY*-T1 载体,进行蓝白斑筛选,选取白色菌落过夜培养,提取质粒,经双酶切鉴定后送样测序,得到含有目的基因完整编码区的重组克隆质粒 *pEASY*-T1/*FoccCSP*1,于 -80℃保存备用。

将表达载体 pET-30a(+)和测序正确的重组克隆质粒 *pEASY*-T1/*FoccCSP*1 分别经 *Bam*H I 和 *Hin*d III 于 37℃ 酶切 4 h,将割胶回收纯化酶切完全的 pET-30a(+)片段和 *FoccCSP*1 经 T4 DNA 连接酶于 16℃反应 16 h 后,转化到大肠杆菌感受态细胞 *Trans*1-T1 中,涂布到含有 Kan(终浓度 50 μg/mL)抗性的 LB 固体培养基中培养,挑选单克隆菌落到含有 Kan(终浓度 50 μg/mL)抗性的 LB 液体培养基中培养,提取质粒,经双酶切鉴定后测序,测序正确的重组表达质粒 pET-30a(+)/*FoccCSP*1 于 -80℃保存,用于后续原核表达。

1.8 西花蓟马化学感受蛋白原核表达与纯化

目的蛋白表达:将重组表达质粒 pET30a(+)/*FoccCSP*1 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)PlysS 表达感受态细胞中,转化的细胞接种入 LB/Kan(Kan 终浓度 50 μg/mL)固体培养基中 37℃ 倒置过夜培养。挑取重组表达质粒大肠杆菌单菌落于 5 mL 含硫酸卡那霉素抗性的 LB 培养液中(Kan 终浓度 50 μg/

mL)，37℃过夜培养；按 1% 接菌量将过夜培养液加入到含硫酸卡那霉素抗性的 500 mL LB 培养液中(Kan 终浓度 50 μg/mL)，37℃ 200 r/min 震荡培养至 OD_{550} 为 0.5 左右，添加 IPTG 至终浓度 0.8 mmol/L，30℃ 120 r/min 震荡培养 8 h，诱导表达目的蛋白。

融合蛋白纯化：将诱导表达的菌液于 4℃ 5 000 r/min 离心 30 min，将沉淀重悬到 50 mL 结合缓冲液中，经超声波破碎，将菌体悬浊液于 4℃ 5 000 r/min 离心 30 min，保留上清；同时对包涵体进行破碎[用溶液(50 mmol/L Tris-HCl，pH 6.8，加 0.2% Triton X-100)溶解包涵体，离心后将沉淀溶于 5 mL 8 mol/L 尿素中，加入 5 mL 溶液(200 mmol/L Tris-HCl，pH 为 8.0，加 10 mmol/L DTT)，室温静置 60 min；加入 1.6 mL 溶液(0.5 mol/L NaOH + 5 mmol/L Cystine)，室温放置 10 min；再加入 10 倍体积的溶液(100 mmol/L Tris-HCl，pH 为 8.0，加 5 mmol/L Cysteine)，混匀后摇床摇晃 24 h，6 000 r/min 离心 30 min，保留上清]。上清液经微孔滤膜(0.45 μm)过滤，然后用 Ni 柱纯化目的蛋白，用不同浓度咪唑(10，20，30，50，70，90，100，200，300 和 500 mmol/L)洗脱缓冲液对 Ni 柱进行梯度洗脱，经 SDS-PAGE 电泳，将含有目的蛋白的洗脱液转移到装有 PBS 缓冲液(pH 7.2)的透析袋中，4℃轻微摇晃过夜透析；透析液经超滤管(截留分子量为 10 kD)浓缩纯化目的蛋白；添加重组肠激酶于 37℃ 酶切 16 h，切去 His 标签；再次过柱纯化获得不带融合标签的目的蛋白；测定酶切纯化后的目的蛋白浓度，用于多克隆抗体制备。

1.9 抗血清的制备及检测

抗血清制备：免疫用兔子为 2.0 kg 左右的新西兰大白兔，免疫之前耳静脉取阴性血清。取 200 μg 免疫蛋白，稀释后加入等体积弗氏完全佐剂，混匀后进行背部皮下注射免疫，分别于 15 d 和 25 d 后进行第 1 次和第 2 次加强免疫，免疫蛋白稀释后加入等体积弗氏不完全佐剂；第 2 次加强免疫后 1 周，在耳静脉取血，离心后收取血清，ELISA 测定免疫效价；然后将免疫兔子用麻醉剂麻醉后，颈动脉取阳性血，离心后收取血清。

抗体纯化：用相应的偶联缓冲液以 1∶3(v/v)稀释血清、配平，10 000 r/min 4℃ 离心 20 min，0.22 μm 滤膜过滤，除去脂肪、细胞残渣及小颗粒物质；用 8 倍柱体积的相应偶联缓冲液平衡预装亲和柱，保持流速为 4 s/滴；将样品注入柱子，保持流速为 5 s/滴，收集流出液；用 5 倍柱体积的偶联缓冲液过柱，保持流速为 4 s/滴，除去其他抗体；在对应所需中和液附近取几个值，加入 EP 管，滴加洗脱液到 1.0 mL，混匀后调整中和液 pH 为 7.0；取 5 个 EP 管，根据中和液调试结果，按量分别加入中和液；用 5 倍柱体积洗脱缓冲液洗脱抗体，收集于 EP 管中。纯化抗体浓度测定后分装，-80℃保存。

1.10 西花蓟马化学感受蛋白的免疫定位

将西花蓟马初羽化成虫浸入含 4% 多聚甲醛和 2% 戊二醛的 0.1 mol/L PBS(pH 7.4)溶液中 4℃过夜固定；用 0.1 mol/L PBS 冲洗后，用 30%，50%，70%，80%，90%，95% 和 100% 的酒精梯度脱水；脱水后分别用 2∶1，1∶1 和 1∶2(v/v)的乙醇/LR White 树脂浸透身体组织，然后置于纯的 LR White 树脂中 4℃ 浸透过夜；将树脂置于明胶胶囊中，于 60℃聚合；采用 EM UC6 切片机(LEICA 公司)切片，厚度为 120 nm，切片置于铜网上；切片用重蒸水冲洗后，将 G 液(含有 50 mmol/L 甘氨酸的 PBS 溶液，pH 7.4)逐滴加在湿润的封口膜上，将铜网倒扣在液滴上封闭 15 min，再重复该步骤 1 次；铜网用重蒸水冲洗 6 次，转移到 T 液(含 0.05% 的明胶的 PBS 溶液，pH 7.4)上培育 30 min，重复该步骤 1 次；重蒸水冲洗后，将铜网置于一抗(T 液稀释一抗 2 000 倍)避光标记 60 min，然后 4℃反应过夜；重蒸水冲洗后，加入稀释好的和 10 nm 胶体金颗粒偶联的羊抗兔二抗(用 T 液稀释 20 倍)避光室温反应 90 min；经 T 液、G 液、PBS、双蒸水清洗后，加增感液避光 20 min 进行银增感；双蒸水清洗后，用 2% 醋酸双氧铀染色 10 min；再用温热的双蒸水清洗，干燥后用 HITACHI H-7500 TEM 透射电镜进行观察。用免疫前的兔血清代替一抗作为对照。

2 结果与分析

2.1 西花蓟马化学感受蛋白基因全长 cDNA 分子克隆及序列分析

采用 RT-PCR 和 RACE 技术，克隆得到新的西花蓟马化学感受蛋白基因全长 cDNA 序列，命名为 *FoccCSP*1，提交至 GenBank(登录号：KM527949)。

*FoccCSP*1 全长 cDNA 序列 597 bp，其中开放阅读框(ORF)288 bp，编码 95 个氨基酸，3′端非编码区 253 bp，有真核生物典型的 polyA 加尾结构(图 1)，表明该基因 3′末端是完整的。5′末端非编码区 56 bp，同源序列分析表明 5′端也是完整的。该基因推导的氨基酸序列具有昆虫化学感受蛋白的典型特

征，即具有 4 个保守的半胱氨酸残基，其排列方式符合 C1-X_6-C2-X_{18}-C3-X_2-C4 的结构特点；预测该成熟蛋白分子量为 11.377 kD，等电点为 4.72，在线信号肽预测程序预测后发现该蛋白没有信号肽。

2.2　FoccCSP1 氨基酸序列的比对及系统进化分析

采用 BLASTx 程序对 FoccCSP1 序列进行同源相似性搜索（e-value 均小于 10e-5），前 100 个 CSPs 序列中，属于膜翅目昆虫的最多，占总量的 31%，其次是鞘翅目和双翅目昆虫，分别占 26% 和 24%，数量较少的为同翅目、直翅目和虱目的昆虫，分别占 13%，5% 和 1%。与 FoccCSP1 序列一致性最高的为东亚飞蝗 LmigOS-D（GenBank 登录号 CAJ01476.1），氨基酸序列一致性为 61%，其次是与侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* MmedCSP1（GenBank 登录号 ABO15560.1），氨基酸序列一致性为 54%，与其他昆虫的 CSPs 序列一致性均在 40% ~50% 之间。序列比对结果表明，101 个序列都具有化学感受蛋白典型的 4 个保守半胱氨酸位点；除此之外，在第 3 个保守半胱氨酸位点前第 5 个氨基酸都为丙氨酸，在这些 CSPs 中也很保守（图 2）。

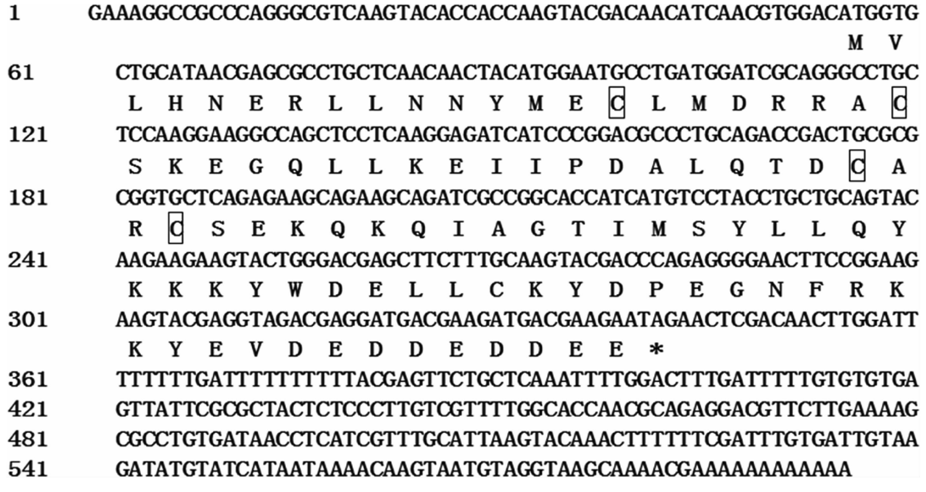


图 1　西花蓟马 *FoccCSP*1 cDNA 核苷酸及推导的氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *FoccCSP*1 cDNA from *Frankliniella occidentalis*

终止密码子以星号标出；4 个保守的半胱氨酸位点用方框标出。The stop codon is indicated with an asterisk, and four conserved cysteines are showed with boxes.

```
FoccCSP1   ----------------------------------------MVLHNERLL 9
LmigCSP    ---------MVTVSSAAP---AKCASIAANDKK--YTTRYDNIDIESILKSERLL29
TcasCSP14  -----MIKRKFRFIPVHDFVNGKTLHRSTRDDK--YTTRYDNVDVDRILHSKRLL48
MmedCSP1   --MKVAI-IFLAIIAV----------ALAATTKT--YTSKFDDVDVDGILGSDRLL42
MdomCSP    -MKFLCIAFVVAAFLL----------AIASAGDK--YTTKYDNIDVDNILKSERLL43
AlucCSP3   --MKVAVLVLLCVG--A-----------ALSAEV--YTSKYDNIDVDKILSNDRIL39
HarmCSP6   ----MKADCFLFVTLIA-----------VVAADF--YNSKYDSFDVQPLLENDRIL40
NlugCSP5   MR-CLLLVAVVCAALVA-----------VCHAQDSKYTSKYDNIDIDKILKNDRVL44
PhumCSP    MKVAFVLFCAFALAAGA----------RVPRDEK--YSTKYDNIDLDSILKNDRLL44

FoccCSP1   NNYMECLMDRRACSKEGQLLKEIIPDALQTDCARCSEKQKQIAGTIMSYLLQYKKK 65
LmigCSP    RNYFDCLMDRGTCTQEGCLLRAAIPDALQNDCSKCSDVQKKQAGRVMAWILENKRN 85
TcasCSP14  LNYINCLLEKGPCSPEGRELKKILPDALVTNCSKCSEVQKKQAGKILTFVLLNYRN104
MmedCSP1   RNYVNCLLDRGPCTKEGVTLKEILPDALATSCESCTEKQKTKSEKVIRHLVNNKKE 98
MdomCSP    NNYLNCLMDKGSCSPEGQELKKAIPDALQTECSKCSEKQKKAVDKVAHFLIDNKPE 99
AlucCSP3   TQYIKCLMEEGNCTNEGKELKKTLPDALASGCTKCSEKQKAQTEKVLRHLSKNRPR 95
HarmCSP6   LSYTKCFLDQGPCTPDAKDFKKVIPEALETTCGKCSPKQKQLIKTVIKAVISRHPD 96
NlugCSP5   SQYIKCLMGEGSCTQEGRELKRLLPDAIQSNCSKCSEKQRSASVKVMRHLRQSRER100
PhumCSP    QNYVNCLLDKGTCTPEGTDLKKVLPDALENACAKCSEAQKRGAEKVIRHLLENKKD100

FoccCSP1   YWDELLCKYDPEGNFRKKYEVDED-DE--DDEE------------------ 95
LmigCSP    YWDELIAKYDPEGNFRKKYGYDED-DD--EEEK------------------115
TcasCSP14  EWNQLVAKYDPDGIYRKQYEIDDDYDYSELDSAKK----------------139
MmedCSP1   LWDELAVKYDPNNEYRKKYEDQAKAKGINV---------------------128
MdomCSP    QWKQLQAKYDPDNVYYGKYKKHL----------------------------122
AlucCSP3   DWNRLKNKYDPKGEYSKKYEKEAKAISA-----------------------123
HarmCSP6   AWDQLTEKYDKDQKYKESFDKFLAEQD------------------------123
NlugCSP5   DWNRLLDKYDPQG-DKRKNLKLD----------------------------122
PhumCSP    VFTLLEAKYDPNGVYRKKYEAEAQKRKIQL---------------------130
```

图 2　FoccCSP1与其他目昆虫的 CSPs 序列比对

Fig. 2　Alignment of FoccCSP1 with CSPs from insects of other orders

4 个保守的半胱氨酸用红色底纹标出，其他保守氨基酸残基用黄色底纹标出。Four conserved cysteines are labeled in red, and other conserved residues are labeled in yellow. CSPs 来源昆虫种名、所属目及 GenBank 登录号 Source insect species and orders and the GenBank accession numbers of CSPs：FoccCSP1：西花蓟马 *Frankliniella occidentalis*，缨翅目 Thysanoptera，KM527949；LmigCSP：东亚飞蝗 *Locusta migratoria*，直翅目 Orthoptera，CAJ01476.1；TcasCSP14：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*，鞘翅目 Coleoptera，EFA07564.1；MmedCSP1：侧沟茧蜂 *Microplitis mediator*，膜翅目 Hymenoptera，ABO15560.1；MdomCSP：家蝇 *Musca domestica*，双翅目 Diptera，XP_005182269.1；AlucCSP3：绿盲蝽 *Apolygus lucorum*，半翅目 Hemiptera，AGD80083.1；HarmCSP6：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*，鳞翅目 Lepidoptera，AEX07267.1；NlugCSP5：褐飞虱 *Nilaparvata lugens*，同翅目 Homoptera，ACJ64052.1；PhumCSP：体虱 *Pediculus humanus corporis*，虱目 Anoplura，XP_002432594.1.

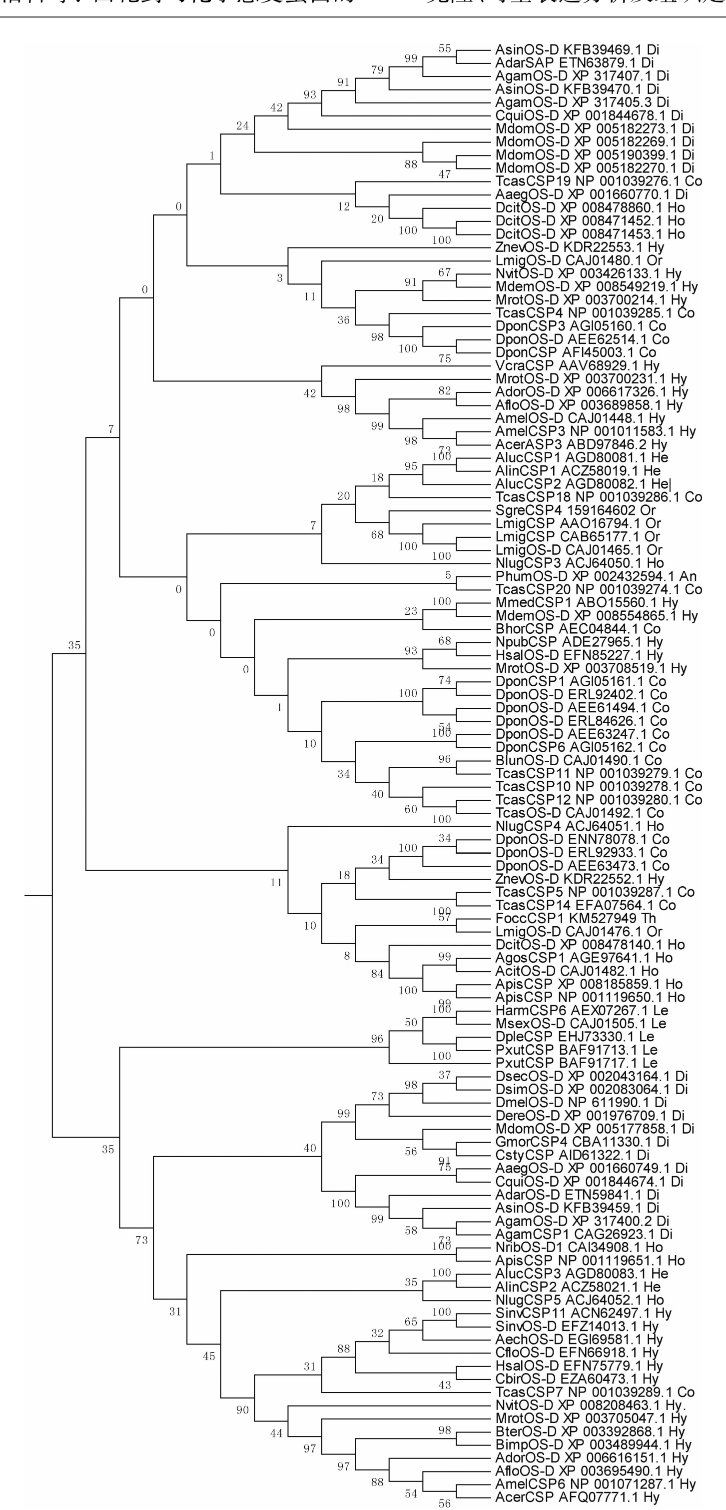


图 3　基于 NJ 法构建的 FoccCSP1 及其他昆虫 CSPs 进化树

Fig. 3　Neighbor joining (NJ) distance tree of FoccCSP1 protein sequences and CSPs from other insects

每一枝节点上的 bootstrap 数值表示 1 000 次重复计算的百分比值。Bootstrap values (%) are based on 1 000 replicates. 蛋白名后为序列登录号和昆虫所属目的缩写 GenBank accession numbers of CSPs and the abbreviation of insect orders are included with species abbreviations for taxon identification. Th：缨翅目 Thysanoptera；Hy：膜翅目 Hymenoptera；Le：鳞翅目 Lepidoptera；Ho：同翅目 Homoptera；Co：鞘翅目 Coleoptera；Or：直翅目 Orthoptera；He：半翅目 Hemiptera；Di：双翅目 Diptera. Aech：切叶蚁 *Acromyrmex echinatior*；Apis：豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum*；Alin：苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus*；Aaeg：埃及伊蚊 *Aedes aegypti*；Adar：中华按蚊 *Anopheles darlingi*；Agam：冈比亚按蚊嗜虫 *Anopheles gambiae str.* PEST；Asin：中华按蚊 *Anopheles sinensis*；Acit：桔蚜 *Aphis citricidus*；Agos：棉蚜 *Aphis gossypii*；Acer：中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*；Ador：大蜜蜂 *Apis dorsata*；Aflo：小蜜蜂 *Apis florea*；Amel：西方蜜蜂 *Apis mellifera*；Aluc：绿盲蝽 *Apolygus lucorum*；Bhor：云斑天牛 *Batocera horsfieldi*；Blun：毛蕈甲 *Biphyllus lunatus*；Bter：欧洲熊蜂 *Bombus terrestris*；Csty：丽蝇类 *Calliphora stygia*；Cflo：佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus*；Cbir：行军蚁 *Cerapachys biroi*；Cqui：致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*；Dple：黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus*；Dpon：中欧山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae*；Dcit：柑桔木虱 *Diaphorina citri*；Dmel：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*；Dsec：果蝇 *Drosophila sechellia*；Dsim：拟果蝇 *Drosophila simulans*；Focc：西花蓟马 *Frankliniella occidentalis*；Gmor：舌蝇 *Glossina morsitans morsitans*；Hsal：印度跳蚁印度跳蚁 *Harpegnathos saltator*；Harm：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*；Lmig：东亚飞蝗 *Locusta migratoria*；Msex：烟草天蛾 *Manduca sexta*；Mrot：苜蓿切叶蜂 *Megachile rotundata*；Mdem：侧沟茧蜂 *Microplitis demolitor*；Mdom：家蝇 *Musca domestica*；Nvit：丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*；Nlug：褐飞虱 *Nilaparvata lugens*；Pxut：柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*；Phum：体虱 *Pediculus humanus corporis*；Sgre：沙漠蝗 *Schistocerca gregaria*；Sinv：入侵红火蚁 *Solenopsis invicta*；Tcas：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*；Vcra：黄边胡蜂 *Vespa crabro*；Znev：内华达古白蚁 *Zootermopsis nevadensis*.

采用 MEGA6 的 Neighbor-joining 法对 8 个目 46 种昆虫的 111 个化学感受蛋白构建了进化树(图 3),进化树划分为 3 大分支,FoccCSP1 与 6 个同翅目、5 个鞘翅目、1 个直翅目、1 个膜翅目昆虫的化学感受蛋白位于同一个分支,其中与 FoccCSP1 进化关系最近的是东亚飞蝗的化学感受蛋白(GenBank 登录号: CAJ01476.1),表明这两个基因可能有共同的祖先基因;其次是同翅目昆虫柑桔木虱 *Diaphorina citri*(GenBank 登录号: XP_008478140.1)、棉蚜 *Aphis gossypii*(GenBank 登录号: AGE97641.1)、桔蚜 *Aphis citricidus*(GenBank 登录号: CAJ01482.1)、豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum*(GenBank 登录号: XP_008185859.1 和 NP_001119650.1)的化学感受蛋白,与 FoccCSP1 位于同一分支的还有赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*(GenBank 登录号: EFA07564.1 和 NP_001039287.1)、中欧山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* (GenBank 登录号: AEE63473.1, ERL92933.1 和 ENN78078.1)、内华达古白蚁 *Zootermopsis nevadensis*(GenBank 登录号: KDR22552.1)、褐飞虱 *Nilaparvata lugens*(GenBank 登录号: ACJ64051.1)的化学感受蛋白,表明 FoccCSP1 与以上昆虫的化学感受蛋白的亲缘关系较近。

2.3 西花蓟马 *FoccCSP1* 的表达谱分析

为了明确 *FoccCSP1* 在西花蓟马体内的时空表达,采用 RT-qPCR 方法对西花蓟马不同发育时期和初羽化成虫不同组织 *FoccCSP1* 的表达量进行了分析。

FoccCSP1 在西花蓟马不同发育阶段中的相对表达量以该基因在羽化 10 d 雄虫中的表达量为标准参量,结果表明,*FoccCSP1* 在不同发育期的表达丰度差异较大,在羽化 1 d 雌虫中的相对表达量最高,为标准参量的 2 386.86 倍;其次为 2 龄若虫,为标准参量的 875.03 倍;相对表达量较高的还有羽化 1 d 的雄虫,其相对表达量为标准参量的 103.02 倍;1 龄若虫、羽化 5 d 雄虫、羽化 5 d 雌虫、羽化 10 d 雌虫中的相对表达量依次递减,分别为标准参量的 8.47, 3.39, 2.16 和 1.15 倍;相对表达量最低的阶段为羽化 15 d 的雌、雄虫和蛹,相对表达量仅为标准参量的 1.05, 0.86 和 0.84 倍(图 4)。可见,不同发育期的转录水平中,该基因主要在初羽化雌性成虫和 2 龄若虫中表达。

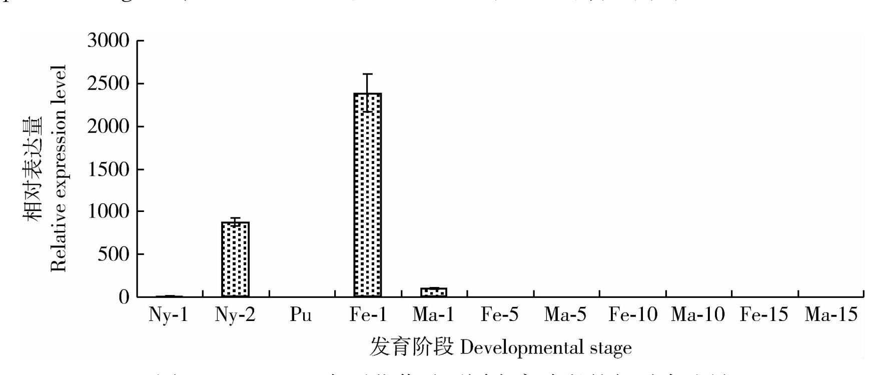


图 4　*FoccCSP1* 在西花蓟马不同发育阶段的相对表达量

Fig. 4　Relative expression level of *FoccCSP1* in *Frankliniella occidentalis* at different developmental stages

Ny-1: 1 龄若虫 1st instar nymph; Ny-2: 2 龄若虫 2nd instar nymph; Pu: 蛹 Pupa; Fe-1, Fe-5, Fe-10, Fe-15: 分别为羽化 1, 5, 10 和 15 d 的雌成虫 1-day-old, 5-day-old, 10-day-old, and 15-day-old female adult, respectively; Ma-1, Ma-5, Ma-10, Ma-15: 分别为羽化 1, 5, 10 和 15 d 的雄成虫 1-day-old, 5-day-old, 10-day-old, and 15-day-old male adult, respectively. 误差线表示样品 3 次重复的标准误。Error bars represent the standard error of three independent samples.

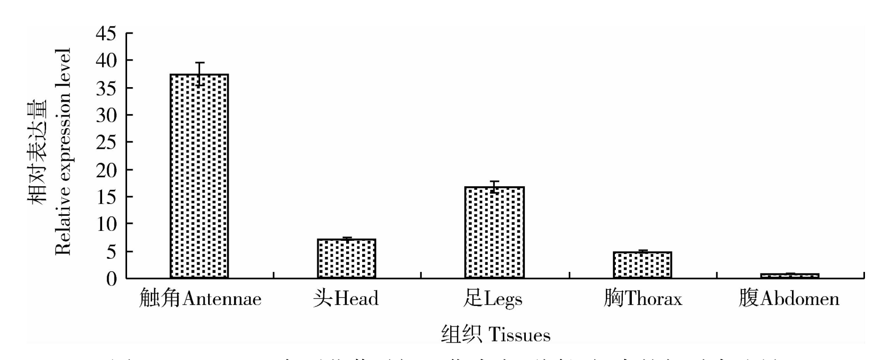


图 5　*FoccCSP1* 在西花蓟马初羽化成虫不同组织中的相对表达量

Fig. 5　Relative expression level of *FoccCSP1* in different tissues of *Frankliniella occidentalis* adults

误差线表示样品 3 次重复的标准误。Error bars represent the standard error of three independent sample preparations.

*FoccCSP*1 在西花蓟马初羽化成虫不同组织中的相对表达量以该基因在腹部中的表达量为标准参量，结果表明，*FoccCSP*1 在初羽化成虫的各个组织中广泛表达，不具有组织特异性表达特征，在触角中的相对表达量最高，为腹部中表达量的 37.55 倍；其次为足，相对表达量是腹部中表达量的 16.79 倍；在头部和胸部也有少量表达，相对表达量分别为腹部中表达量的 7.24 倍和 4.97 倍（图 5）。

2.4　重组克隆质粒和重组表达质粒的构建及验证

根据表达载体 pET-30a（＋）的序列特征，设计分别带有酶切位点 *Bam*H I 和 *Hin*d III 的正反向引物扩增开放阅读框（ORF），将目的基因克隆到克隆载体 *pEASY*-T1 上，成功构建了重组克隆质粒 *pEASY*-T1/*FoccCSP*1。将重组克隆质粒 *pEASY*-T1/*FoccCSP*1 和表达载体 pET-30a（＋）分别进行双酶切，将酶切后的目的基因片段和表达载体 pET-30a（＋）片段经 T4 DNA 连接酶连接，测序发现插入的目的基因碱基序列及表达载体片段序列完全正确，表明成功构建了重组表达质粒 pET-30a（＋）/*FoccCSP*1（图 6）。

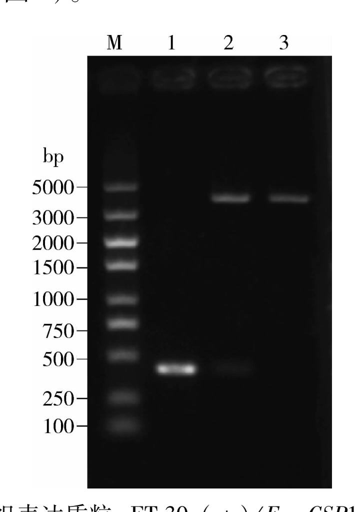


图 6　重组表达质粒 pET-30a（＋）/*FoccCSP*1 鉴定图谱

Fig. 6　Identification of the reconstruction of expression plasmid pET-30a（＋）/ *FoccCSP*1

M：分子量标准 DNA marker；1：菌落 PCR 产物 Product of the colony PCR；2：pET-30a（＋）/ *FoccCSP*1 经 *Bam*H I 和 *Hin*d III 酶切后的产物 Two fragments after digestion of the reconstructed expression plasmid with restriction enzymes *Bam*H I and *Hin*d III；3：pET-30a（＋）经 *Bam*H I 和 *Hin*d III 酶切后的产物 Two fragments after digesting the expression plasmid pET-30a（＋）with restriction enzymes *Bam*H I and *Hin*d III.

2.5　FoccCSP1 在大肠杆菌中的诱导表达及纯化

为了制备 FoccCSP1 蛋白的多克隆抗体，将重组质粒 pET30a（＋）/*FoccCSP*1 在大肠杆菌 BL21（DE3）中诱导表达，对诱导培养的细胞沉淀破碎处理，经 SDS-PAGE 检测，发现重组蛋白在上清液和包涵体中均有表达（图 7），将上清液和包涵体破碎处理后的上清液经亲和层析柱纯化，得到带有 His-tag 表达标签的 FoccCSP1 蛋白，经重组牛肠激酶切除 His-tag 标签，再次过亲和层析柱纯化，获得目的蛋白。

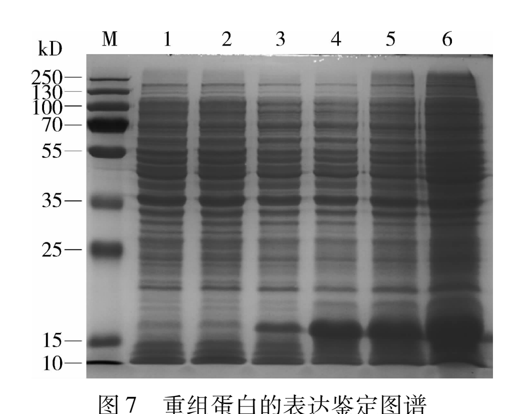


图 7　重组蛋白的表达鉴定图谱

Fig. 7　Identification of the expressed fusion protein by SDS-PAGE

M：蛋白分子量标准 Standard protein molecular weight marker；1：空载未诱导 Non-induced BL21 bacteria within pET-30a（＋）vector；2：空载已诱导 Induced BL21 bacteria within pET-30a（＋）vector；3：重组载体未诱导 Non-induced BL21 bacteria within pET-30a/*FoccCSP*1 vector；4：诱导的重组载体 Induced BL21 bacteria within pET-30a/*FoccCSP*1 vector；5：重组载体诱导后上清 Supernatant of induced BL21 bacteria within pET-30a/*FoccCSP*1 vector；6：重组载体诱导后包涵体 Sediment of induced BL21 bacteria within pET-30a/*FoccCSP*1 vector.

2.6　西花蓟马 FoccCSP1 蛋白免疫定位

以 FoccCSP1 蛋白作为免疫蛋白免疫新西兰大白兔后，耳静脉取血，包被筛选目的蛋白，经 ELISA 测定免疫效价可达 1∶6 400 以上，达到多克隆抗体的要求，然后颈动脉取血，离心收集多抗血清，并经过柱纯化获得 FoccCSP1 蛋白多克隆抗体，以该抗体为一抗，以 10 nm 胶体金颗粒偶联的羊抗兔为二抗进行西花蓟马 FoccCSP1 蛋白免疫定位（图 8）。结果显示，该蛋白抗体具有较强的免疫特异性，能与该蛋白很好地结合，并确切地反映出该蛋白的分布。胶体金颗粒在西花蓟马触角、感器、头、足等部位血淋巴中都明显标记，可见该蛋白基因组织分布广泛，与该基因基于 qRT-PCR 表达谱检测结果吻合。推测该基因除了参与环境气味物质的识别、运输外，还可能参与感受机械刺激、调节生长发育或其他重要的生理功能。

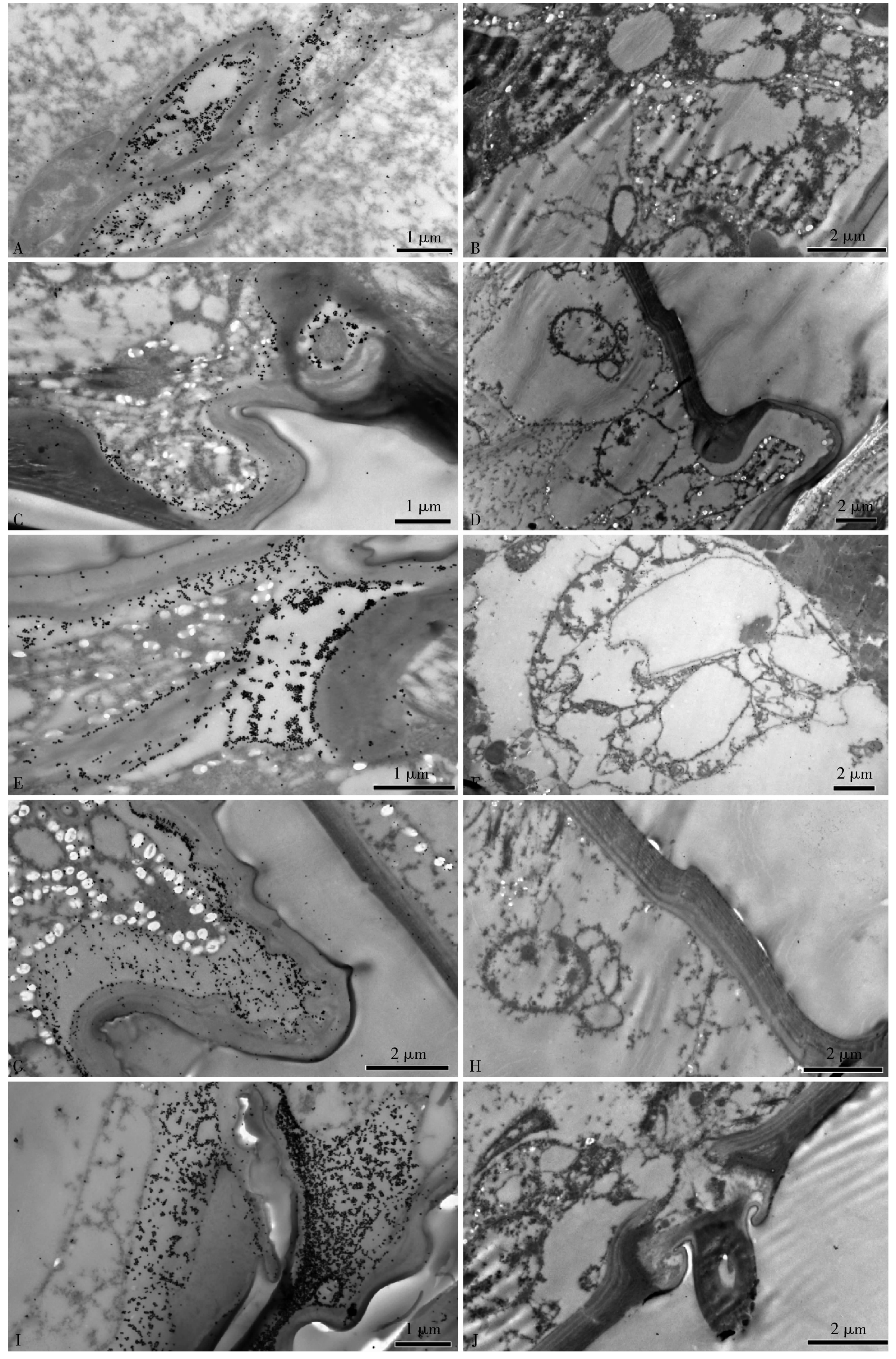


图 8 FoccCSP1 蛋白在西花蓟马成虫触角、头、足中的免疫定位

Fig. 8 Immunocytochemical localization of FoccCSP1 in antennae, legs and head of *Frankliniella occidentalis* adults

A：触角 1 Antenna 1；B：触角 1 对照 CK of antenna 1；C：触角 2 Antenna 2；D：触角 2 对照 CK of antenna 2；E：头部 Head；F：头部对照 CK of head；G：足 1 Leg 1；H：足 1 对照 CK of leg 1；I：足 2 Leg 2；J：足 2 对照 CK of leg 2.

3　讨论

目前已报道的 CSPs 大多源自鳞翅目(Maleszka and Stange, 1997; Bohbot *et al*., 1998; Nagnan-Le Meillour *et al*., 2000; Picimbon *et al*., 2000a; Jacquin-Joly *et al*., 2001; Gong *et al*., 2007; Ozaki *et al*., 2008; Yoshizawa *et al*., 2011)和膜翅目(Briand *et al*., 2002; Calvello *et al*., 2005; Forêt *et al*., 2007; Lu *et al*., 2007; Li *et al*., 2011)的昆虫,还有少量的 CSPs 源自蜚蠊目(Kitabayashi *et al*., 1998; Picimbon and Leal, 1999), 竹节虫目(Mameli *et al*., 1996; Marchese *et al*., 2000), 直翅目(Angeli *et al*., 1999; Ban *et al*., 2003; Jin *et al*., 2005), 双翅目(Wanner *et al*., 2004; Zhou *et al*., 2006)和半翅目(Jacobs *et al*., 2005)等的昆虫,而缨翅目昆虫的 CSPs 很少见报道。本研究采用 RT-PCR 和 RACE 技术,克隆并鉴定了一西花蓟马化学感受蛋白基因 *FoccCSP*1,该基因推导的氨基酸序列含有 4 个保守的半胱氨酸残基,具有昆虫化学感受蛋白的典型特征,表明成功获得一西花蓟马化学感受蛋白基因 cDNA 序列,为发掘及鉴定更多西花蓟马化学感受蛋白基因提供了参考。

同源相似性搜索序列的 e-value 均小于 10e-20,表明可信度非常高。前 100 个 CSPs 序列中源自膜翅目、鞘翅目、双翅目的昆虫较多,还有少量的 CSPs 源自同翅目、直翅目和虱目的昆虫。有研究报道, CSPs 具有高度相似保守性,即便是不同的昆虫种类、不同目的昆虫之间的氨基酸序列一致性平均可达 50% (Wanner *et al*., 2004; Pelosi *et al*., 2006; Gong *et al*., 2007),而本研究搜索出的与 FoccCSP1 同源性较高的前 100 个 CSPs 中,98% 的序列与 FoccCSP1 的氨基酸序列一致性在 40% ~50% 之间。由于 GenBank 中搜索出的 CSPs 均来自其他目的昆虫,有可能缨翅目昆虫 CSPs 与其他目昆虫的 CSPs 关系较远,或 FoccCSP1 进化的速度较快。

系统进化分析表明,FoccCSP1 主要与同翅目和鞘翅目昆虫的化学感受蛋白位于同一个分支,表明西花蓟马 FoccCSP1 与同翅目和鞘翅目昆虫 CSP 亲缘关系较近;而双翅目、鳞翅目、半翅目等昆虫 CSP 位于另外两大分支,表明西花蓟马 FoccCSP1 与这些昆虫 CSPs 分化得较快。

大多 OBPs 仅在触角中特异性表达,而 CSPs 广泛存在于昆虫不同器官中,如触角(Angeli *et al*., 1999; Jacquin-Joly *et al*., 2001; Liu *et al*., 2010; Liu *et al*., 2012)、头(Gu *et al*., 2012)、足(Nomura *et al*., 1992; Kitabayashi *et al*., 1998)、胸(Gu *et al*., 2012)、翅(Ban *et al*., 2003; Zhou *et al*., 2008)、下颚须(Maleszka and Stange, 1997)、下唇须(Jin *et al*., 2005)、喙(Nagnan-Le *et al*., 2000)、性腺(Jacquin-Joly *et al*., 2001)、射精管(Sabatier *et al*., 2003)等组织中都有表达。本研究采用 RT-qPCR 技术,测定了 *FoccCSP*1 基因在西花蓟马不同发育阶段及不同组织中也都有不等量的表达,支持上述观点,暗示其对西花蓟马的生长发育具有重要的调控作用,但在各个发育阶段的表达丰度差异较大,在羽化 1 d 雌成虫中的转录水平最高,推测该基因很可能与西花蓟马的性信息素的形成与释放、交尾等生殖系统的发育或行为有关;在 2 龄若虫中的转录水平较高,暗示该基因可能调节 2 龄若虫的生长发育;在羽化 15 d 的雌雄成虫和蛹中的相对表达量都很低,羽化 15 d 后的雌雄成虫因已完成交尾、产卵等种群繁衍重任,寿命接近尾声,活动能力明显减弱,蛹期也是该虫活动能力最弱的一个发育阶段,暗示该基因可能参与西花蓟马生命活动相关的一些重要生理功能。*FoccCSP*1 较为广泛地在初羽化成虫的触角、头(去除触角)、足、胸、腹等组织中表达,在触角中的相对表达量最高,由于触角是西花蓟马最为主要的嗅觉器官,推测该基因主要参与西花蓟马识别、定位寄主植物等功能;在足中的相对表达量也较高,由于西花蓟马足上有大量的刺形感器,暗示该基因在化学机械感受方面行使着特定的功能;在头部和胸部也有一定量的表达,鉴于头部具有发达的味觉系统和感觉神经系统,推测该基因除了具有嗅觉识别功能外,还有可能在味觉或其他化学感受中起一定的作用。

本研究成功构建了重组表达质粒 pET-30a(+)/*FoccCSP*1,将该重组质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)表达感受态细胞中,培养后经 IPTG 诱导表达,当 IPTG 终浓度为 1.5 mmol/L,35℃下,目的蛋白在较短时间内大量表达,但经 SDS-PAGE 检测后发现目的蛋白多以包涵体的形式存在,可能是表达量过高、合成速度太快、蛋白无法达到足够的溶解度等原因造成,为后续蛋白的纯化增加了难度,而且包涵体处理后目的蛋白的浓度会降低。后经几次诱导条件摸索,发现当添加的 IPTG 终浓度为 0.8 mmol/L、温度 30℃并低速震荡培养,目的蛋白多以可溶性蛋白形式存在,并经 Ni 柱纯化,获得目的蛋

白，为了避免融合标签对目的蛋白在后续试验中的影响，采用重组肠激酶切去融合标签，再经 Ni 柱纯化，成功获得不带融合标签的目的蛋白。

为进一步探讨 FoccCSP1 的功能，将纯化得到的 FoccCSP1 蛋白作为免疫原免疫新西兰大白兔后成功制备了 FoccCSP1 蛋白多克隆抗体。免疫定位结果发现，抗体稀释 10 000 倍，仍能与目的蛋白很好地结合，胶体金颗粒标记明显，表明该抗体具有很好的免疫特异性。胶体金颗粒在西花蓟马触角、头、足等部位的血淋巴中明显标记，表明这些部位 FoccCSP1 蛋白分布较多，尤其靠近内表皮处表达量较高，同时也发现在锥形感器和刺形感器血淋巴中也大量存在，可见该蛋白基因组织分布广泛，与该基因基于 qRT-PCR 表达谱检测结果吻合，推测该基因除了参与环境中化学气味物质的识别、运输外，还可能参与感受机械刺激、调节生长发育或其他重要的生理功能，下一步可采用基因沉默、EAG 等技术进一步明确该蛋白基因功能。

参考文献（References）

Angeli S, Ceron F, Scaloni A, Monti M, Monteforti G, Minnocci A, Petacchi R, Pelosi P, 1999. Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *European Journal of Biochemistry*, 262(3): 745－754.

Ban L, Scaloni A, Brandazza A, Angeli S, Zhang L, Yan Y, Pelosi P, 2003. Chemosensory proteins of *Locusta migratoria*. *Insect Molecular Biology*, 12(2): 125－134.

Bohbot J, Sobrio F, Lucas P, Nagnan-Le Meillour P, 1998. Functional characterization of a new class of odorant-binding proteins in the moth *Mamestra brassicae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(2): 489－494.

Briand L, Swasdipan N, Nespoulous C, Bézirard V, Blon F, Huet JC, Ebert P, Pernollet JC, 2002. Characterization of a chemosensory protein (ASP3c) from honeybee (*Apis mellifera* L.) as a brood pheromone carrier. *European Journal of Biochemistry*, 269(18): 4586－4596.

Calvello M, Brandazza A, Navarrini A, Dani FR, Turillazzi S, Felicioli A, Pelosi P, 2005. Expression of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in some Hymenoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(4): 297－307.

Cheng JF, Wan FH, Guo JY, 2006. Analysis of potential distribution of the invaded insect *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) in China. *Acta Entomologica Sinica*, 49(3): 438－446. [程俊峰，万方浩，郭建英，2006. 入侵昆虫西花蓟马的潜在适生区分析. 昆虫学报，49(3): 438－446]

Cockfield SD, Beers EH, Zack RS, 2007. Phenology of western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) on plant species in and near apple orchards in Washington State. *Journal of the Entomological Society of British Columbia*, 104: 35－44.

Dai L, Du YZ, Zhang LW, Zhou FC, Gong WR, Ju RT, 2004. A preliminary study on the suitable establishment areas of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) in China. *Plant Protection*, 30(6): 48－51. [戴林，杜予州，张刘伟，周福才，龚伟荣，鞠瑞亭，2004. 西花蓟马在中国的适生性分布研究初报. 植物保护，30(6): 48－51]

Du YZ, Dai L, Ju RT, Gu J, Diao CY, Gong WR, 2005. Risk analysis of alien invasive Western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(11): 2360－2364. [杜予州，戴霖，鞠瑞亭，顾杰，刁春友，龚伟荣，2005. 入侵害虫西花蓟马在中国的风险性初步分析. 中国农业科学，38(11): 2360－2364]

Forêt S, Wanner KW, Maleszka R, 2007. Chemosensory proteins in the honey bee: insights from the annotated genome, comparative analyses and expressional profiling. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(1): 19－28.

Gai HT, Zhi JR, Li ZX, Jiang YJ, 2010. Survival rates of *Frankliniella occidentalis* and *Frankliniella intonsa* after exposure to adverse temperature conditions. *Chinese Journal of Ecology*, 29(8): 1533－1537. [盖海涛，郅军锐，李肇星，蒋永金，2010. 西花蓟马和花蓟马在温度逆境下的存活率比较. 生态学杂志，29(8): 1533－1537]

Gong DP, Zhang HJ, Zhao P, Lin Y, Xia QY, Xiang ZH, 2007. Identification and expression pattern of the chemosensory protein gene family in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(3): 266－277.

Gu SH, Wang SY, Zhang XY, Ji P, Liu JT, Wang GR, Wu KM, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2012. Functional characterizations of chemosensory proteins of the alfalfa plant bug *Adelphocoris lineolatus* indicate their involvement in host recognition. *PLoS ONE*, 7(8): e42871.

Guo W, Wang XH, Ma ZY, Xue L, Han JY, Yu D, Kang L, 2011. CSP and takeout genes modulate the switch between attraction and repulsion during behavioral phase change in the migratory locust. *PLoS Genetics*, 7(2): e1001291.

Jacobs SP, Liggins AP, Zhou JJ, Pickett JA, Jin X, Field LM, 2005. OS-D-like genes and their expression in aphids (Hemiptera: Aphididae). *Insect Molecular Biology*, 14(4): 423－432.

Jacquin-Joly E, Vogt RG, Francois MC, Nagnan-Le Meillour P, 2001. Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. *Chemical Senses*, 26(7): 833－844.

Jiang XL, Bai S, Xiao S, Yang B, 2001. Service for international flower festival in Kunming of China. *Plant Quarantine*, 15(2): 115－117. [蒋小龙，白松，肖枢，杨碧，2001. 为中国昆明国际花卉节把关服务. 植物检疫，15(2): 115－117]

Jin X, Brandazza A, Navarrini A, Ban L, Zhang S, Steinbrecht RA, Zhang L, Pelosi P, 2005. Expression and immunolocalisation of

odorant-binding and chemosensory proteins in locusts. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(10): 1156 - 1166.

Jones T, Scott-Dupree C, Harris R, Shipp L, Harris B, 2005. The efficacy of spinosad against the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, and its impact on associated biological control agents on greenhouse cucumbers in southern Ontario. *Pest Management Science*, 61(2): 179 - 185.

Kirk WDJ, Terry LI, 2003. The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Agricultural and Forest Entomology*, 5(4): 301 - 310.

Kitabayashi AN, Arai T, Kubo T, Natori S, 1998. Molecular cloning of cDNA for p10, a novel protein that increases in the regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28(10): 785 - 790.

Li XR, Lu DG, Liu XX, Zhang QW, Zhou XG, 2011. Ultrastructural characterization of olfactory sensilla and immunolocalization of odorant binding and chemosensory proteins from an ectoparasitoid *Scleroderma guani* (Hymenoptera: Bethylidae). *International Journal of Biological Sciences*, 7(6): 848 - 868.

Liu N, Ren L, Zhang RZ, Zheng JQ, Wang FX, 2005. Identification of the western flower thrip (*Frankliniella occidentalis*) and its related species. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(3): 345 - 347. [刘宁,任立,张润志,郑建秋,王福祥,2005. 西花蓟马的鉴别及其与近缘种的区别. 昆虫知识,42(3): 345 - 347]

Liu R, He X, Lehane S, Lehane M, Hertz-Fowler C, Berriman M, Field LM, Zhou JJ, 2012. Expression of chemosensory proteins in the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans* is related to female host-seeking behavior. *Insect Molecular Biology*, 21(1): 41 - 48.

Liu X, Luo Q, Zhong G, Rizwan-ul-Haq M, Hu M, 2010. Molecular characterization and expression pattern of four chemosensory proteins from diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Biochemistry*, 148(2): 189 - 200.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25: 402 - 408.

Lu DG, Li XR, Liu XX, Zhang QW, 2007. Identification and molecular cloning of putative odorant-binding proteins and chemosensory protein from the bethylid wasp, *Scleroderma guani* Xiao *et* Wu. *Journal of Chemical Ecology*, 33(7): 1359 - 1375.

Maleszka R, Stange G, 1997. Molecular cloning, by a novel approach, of a cDNA encoding a putative olfactory protein in the labial palps of the moth *Cactoblastis cactorum*. *Gene*, 202(1): 39 - 43.

Mameli M, Tuccini A, Mazza M, Petacchi R, Pelosi P, 1996. Soluble proteins in chemosensory organs of phasmids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26(8): 875 - 882.

Marchese S, Angeli S, Andolfo A, Scaloni A, Brandazza A, Mazza M, Picimbon JF, Leal WS, Pelosi P, 2000. Soluble proteins from chemosensory organs of *Eurycantha calcarata* (Insecta, Phasmatodea). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(11): 1091 - 1098.

McKenna M, Hekmat-Scafe D, Gaines P, Carlson J, 1994. Putative *Drosophila* pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system. *Journal of Biological Chemistry*, 269(23): 16340 - 16347.

Meng XQ, Ming L, Wan FH, Zhou ZS, Wang WK, Zhang GF, 2010. SCAR marker for rapid identification of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(3): 323 - 330. [孟祥钦,闵亮,万方浩,周忠实,王文凯,张桂芬,2010. 西花蓟马的 SCAR 分子检测技术. 昆虫学报,53(3): 323 - 330]

Nagnan-Le Meillour P, Cain AH, Jacquin-Joly E, Francois MC, Ramachandran S, Maida R, Steinbrecht RA, 2000. Chemosensory proteins from the proboscis of *Mamestra brassicae*. *Chemical Senses*, 25(5): 541 - 553.

Nomura A, Kawasaki K, Kubo T, Natori S, 1992. Purification and localization of p10, a novel protein that increases in nymphal regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). *International Journal of Developmental Biology*, 36(3): 391 - 398.

Ozaki K, Utoguchi A, Yamada A, Yoshikawa H, 2008. Identification and genomic structure of chemosensory proteins (CSP) and odorant binding proteins (OBP) genes expressed in foreleg tarsi of the swallowtail butterfly *Papilio xuthus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(11): 969 - 976.

Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvello M, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(14): 1658 - 1676.

Picimbon JF, Dietrich K, Angeli S, Scaloni A, Krieger J, Breer H, Pelosi P, 2000a. Purification and molecular cloning of chemosensory proteins from *Bombyx mori*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 44(3): 120 - 129.

Picimbon JF, Dietrich K, Breer H, Krieger J, 2000b. Chemosensory proteins of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(3): 233 - 241.

Picimbon JF, Leal WS, 1999. Olfactory soluble proteins of cockroaches. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(11): 973 - 978.

Sabatier L, Jouanguy E, Dostert C, Zachary D, Dimarcq JL, Bulet P, ImLer JL, 2003. Pherokine-2 and -3: two *Drosophila* molecules related to pheromone/odor-binding proteins induced by viral and bacterial infection. *European Journal of Biochemistry*, 270(16): 3398 - 3407.

Wanner KW, Willis LG, Theilmann DA, Isman MB, Feng Q, Plettner E, 2004. Analysis of the insect *os-d*-like gene family. *Journal of Chemical Ecology*, 30(5): 889 - 911.

Wu QJ, Xu BY, Zhang ZJ, Zhang YJ, Zhu GR, 2007. Investigation of Beijing, Zhejiang, Yunnan area plant thrips species and its distribution. *China Plant Protection*, 27(1): 32 - 34. [吴青君,徐宝云,张治军,张友军,朱国仁,2007. 京、浙、滇地区植物蓟马种类及其分布调查. 中国植保导刊,27(1): 32 - 34]

Wu QJ, Zhang YJ, Xu BY, Zhu GR, 2005. The biological character, damage and management of an invasive insect pest, *Frankliniella occidentalis*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(1): 11 - 14. [吴青君,张友军,徐宝云,朱国仁,2005. 入侵害虫西花蓟马的生物学、危害及防治技术. 昆虫知识,42(1): 11 - 14]

Xu JJ, Wei LL, 2005. New exotic pest western flower thrips in Lincang.

Plant Quarantine, 19(5): 294 – 295. [徐家菊, 韦丽莉, 2005. 临沧市新发现外来有害生物——西花蓟马. 植物检疫, 19(5): 294 – 295]

Yoshizawa Y, Sato R, Tsuchihara K, Ozaki K, Mita K, Asaoka K, Taniai K, 2011. Ligand carrier protein genes expressed in larval chemosensory organs of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(8): 545 – 562.

Yudin LS, Cho JJ, Mitchell WC, 1986. Host range of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), with special references to *Leucaena glauca*. *Environmental Entomology*, 15(6): 1292 – 1295.

Zhang YJ, Wu QJ, Xu BY, Zhu GR, 2003. Risk of alien invasive species – the damage of western flower thrips in Beijing. *Plant Protection*, 29 (4) : 58 – 59. [张友军, 吴青君, 徐宝云, 朱国仁, 2003. 危险性外来入侵生物-西花蓟马在北京发生危害. 植物保护, 29(4): 58 – 59]

Zheng CY, Liu YH, Zhang NQ, Zhao XL, 2007. Invaded insect pest – *Frankliniella occidentalis* first reported in Shandong province. *Journal of Qingdao Agricultural University* (*Natural Science*), 24 (3): 172 – 174. [郑长英, 刘云虹, 张乃芹, 赵希丽, 2007. 山东省发现外来入侵有害生物——西花蓟马. 青岛农业大学学报(自然科学版), 24(3): 172 – 174]

Zhou JJ, Kan Y, Antoniw J, Pickett JA, Field LM, 2006. Genome and EST analyses and expression of a gene family with putative functions in insect chemoreception. *Chem. Senses*, 31(5): 453 – 465.

Zhou SH, Zhang J, Zhang SG, Zhang L, 2008. Expression of chemosensory proteins in hairs on wings of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Applied Entomology*, 132(6): 439 – 450.

(责任编辑: 赵利辉)